

加拿大蓝靛果忍冬组培快繁技术研究

姜思佳¹, 焦丽¹, 韩曦¹, 赵利群¹, 李滨胜¹, 崔杰^{2*} (1. 黑龙江省森林植物园, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 哈尔滨工业大学, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 [目的]研究加拿大蓝靛果忍冬组培快繁技术。[方法]以黑龙江省森林植物园选育的加拿大蓝靛果忍冬优良品种 J-12 的叶芽、花芽、茎段、叶片为外植体进行组培试验。通过在 MS 培养基上附加不同激素配比, 筛选出最佳外植体和最佳培养基配方。[结果]叶芽为最佳诱导外植体。最佳消毒时间组合为 75% 乙醇 10 s 与 2% NaClO 4 min, 污染率低至 2%。J-12 蓝靛果忍冬品种诱导叶芽分化及增殖的最佳培养基及激素配比是 MS + NAA 0.15 mg/L + 6-BA 1.50 mg/L, 增殖倍数最高可达 8.0 倍; 最佳生根培养基为 1/2MS + IBA 0.50 mg/L + NAA 0.20 mg/L, 生根率为 100.00%。[结论]该研究可为加拿大蓝靛果忍冬的大规模生产提供技术支持。

关键词 蓝靛果忍冬; 组织培养; 分化
中图分类号 S663.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)29-0155-02

A Preliminary Study of Tissue Culture Technique of Canada's *Lonicera edulis*
JIANG Si-jia¹, JIAO Li¹, HAN Xi¹, CUI Jie^{2*} et al (1. Heilongjiang Forest Botanical Garden, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract [Objective] To study the tissue culture technique of Canada's *Lonicera edulis*. [Method] The leaf buds, flower buds, stem segments and leaves of the fine strain J-12 which were selected by Heilongjiang Forest Botanical Garden were used in tissue culture test. The best explants and best media formulations were selected by adding different hormone ratios on MS medium. [Result] Leaf buds were the best induced explants. The optimal disinfection time combination was 75% alcohol 10 s and 2% NaClO 4 min, and the pollution rate was low to 2%. The optimal medium for leaf bud differentiation and proliferation of the J-12 was MS + NAA 0.15 mg/L + 6-BA 1.50 mg/L, with a maximum multiplication factor of up to 8.0 times. The best rooting medium was 1/2 MS + IBA 0.50 mg/L + NAA 0.20 mg/L, the rooting rate was 100.00%. [Conclusion] The study provided technical support for the large-scale production of Canada's *Lonicera edulis*.

Key words *Lonicera edulis*; Tissue culture; Differentiation

蓝靛果忍冬 (*Lonicera edulis*) 又名蓝靛果、羊奶子、山茄子, 是忍冬科忍冬属多年生落叶小灌木^[1], 果实具有很高的营养价值, 抗氧化物质含量较高^[2-8], 是提取食用天然色素的良好资源^[9-10], 既可生食又可加工成浆果产品, 蓝靛果忍冬还可作为观赏树种^[11], 主要分布在我国东北地区、内蒙古及华北等地区^[12-13] 以及俄罗斯远东地区、日本、朝鲜北部。

我国开展蓝靛果忍冬的研究起步比较晚, 野生资源日益枯竭, 优良品种培育进展缓慢, 引进的大部分品种主要来自俄罗斯。目前关于蓝靛果忍冬组培快繁技术的研究已经取得一些进展。Ding 等^[14]、Jin 等^[15] 对外植体消毒和最佳诱导培养基进行筛选; 梁琦兰等^[16] 利用嫩枝茎段诱导成功; 李桂君等^[17] 成功诱导出俄罗斯耐寒蓝靛果忍冬组培苗。该试验所使用植物材料是从加拿大引进的优良品种, 目前国内对其组培技术的研究鲜见报道。该研究以黑龙江省森林植物园选育出的优良品种 J-12 为材料进行组织培养试验, 将组培快繁技术与培育新品种相结合, 有助于提高幼苗繁殖效率、加速育种进程、保护和合理利用蓝靛果忍冬种质资源以及优良品种的示范推广。

1 材料与方法

1.1 材料 试验材料为黑龙江森林植物园选育的加拿大蓝靛果忍冬优良品种 J-12。组培试验在哈尔滨工业大学食品研究院进行。

基金项目 黑龙江省财政林业科技推广示范资金项目“蓝靛果忍冬优良品种繁育及栽培技术推广与示范”([2015]ST-11 号)。
作者简介 姜思佳(1985—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 工程师, 硕士, 从事林木培育、种质资源引种与保存研究。* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事基因工程应用研究。
收稿日期 2017-08-16

1.2 外植体的获得和消毒 12 月份采集蓝靛果忍冬优良品种 J-12 的冬眠枝条, 用自来水清洗, 除去表面灰尘, 然后进行水培。开始阶段, 每 3 d 更换 1 次清水, 萌芽后每 5 d 更换 1 次清水。

将长出的叶芽、花芽、茎段、叶片作为组织培养的试验材料, 取试验材料放入自来水下冲洗 30 min, 在超净工作台上用无菌蒸馏水冲洗 3 次, 然后用 70% 乙醇溶液表面消毒 10 s, 取出后用无菌蒸馏水冲洗 3 次, 再用 2% NaClO 溶液消毒 2~10 min, 无菌蒸馏水冲洗 3 次, 最后放在无菌滤纸上将多余的水分吸干, 以降低污染率和减少玻璃化情况的发生, 筛选出最佳的时间组合。

1.3 最佳诱导培养基的筛选 以 MS 为基本培养基, 分别添加不同浓度的 6-BA (1.00、1.50、2.00 mg/L) 和 NAA (0.10、0.15、0.20 mg/L), 采用 2 因素 3 水平正交设计, 每个处理重复 3 次, 每次重复接种 25 瓶。接种后放入培养箱, 16 h/d 光照, 光照强度为 2 000 lx, 箱内温度调节在 (25 ± 2) °C, 湿度 70%~80%。每天观察培养物情况, 30 d 后统计不同处理方式的诱导率, 并观察记录其生长状况。

1.4 最佳生根培养基的筛选 将诱导出的丛生不定芽切成高 2.5~3.0 cm 的若干单株, 接入 1/2MS、1/2MS + IBA 1.00 mg/L + NAA 0.20 mg/L、1/2MS + IBA 0.50 mg/L + NAA 0.20 mg/L 这 3 种生根培养基中。经过 30 d 培养, 统计各生根培养基中试管苗的生根率。

1.5 炼苗及移栽 将试管苗的封口膜除去, 室温 (25~30 °C) 下遮阳炼苗 3~5 d, 然后从瓶内取出试管苗, 轻轻洗除试管苗根部的琼脂, 移栽到经过高锰酸钾消毒的基质中, 空气湿度保持在 80% 以上。

1.6 统计分析 采用 Exce1 2007 和 SPSS 12.0 软件进行数据分析与处理。

2 结果与分析

2.1 不同消毒时间效果 采用 75% 乙醇和 2% NaClO 组合进行消毒试验,其中乙醇消毒时间为 10 s,NaClO 消毒时间设置为 2、4、6、8、10 min。试验结果表明接种材料的最佳消毒方式是用无菌水冲洗 3 次,后用 75% 乙醇消毒 10 s,再用无菌水冲洗 3 次,再用 2% NaClO 消毒 4 min,最后用无菌水冲洗 3 次,平均污染率低至 2% (表 1)。

表 1 不同消毒时间污染情况

Table 1 The pollution of different disinfection time

消毒时间 Disinfection time//min	接种个数 Inoculated number	污染个数 Polluted number	平均污染率 Average pol- lution rate//%
2	100	24	24
4	100	2	2
6	100	58	58
8	100	31	31
10	100	3	3

2.2 不同外植体的筛选 外植体分别为水培后的叶芽、花芽、茎段、叶片(5 mm×5 mm),采用完全随机分组试验,每种材料接种 25 瓶,重复 3 次。由表 2 可知,叶芽和茎段的分化率较高,分别为 93.33%、50.67%,而花芽和叶片分化率均为 0,叶芽为最佳外植体。

表 2 不同外植体对愈伤组织诱导的影响

Table 2 Effects of different explants on callus induction

外植体 Explants	接种瓶数 Inoculated number	分化率 Differentiation rate//%	生长情况 Growth situation
叶芽 Leaf buds	75	97.33	产生丛生芽
花芽 Flower buds	75	0	褐化死亡
茎段 Stem segments	75	50.67	产生丛生芽
叶片 Leaves	75	0	褐化死亡

2.3 不同激素浓度对外植体分化的影响 将蓝靛果忍冬 J-12 外植体叶芽接种于诱导培养基上,7 d 后叶芽开始萌动,并逐渐伸长,15 d 后芽长到 1.0~1.5 cm,30 d 后芽高平均达 3.0 cm,呈嫩绿色。不同浓度 NAA、6-BA 激素对比对蓝靛果忍冬 J-12 叶芽诱导率以及增值倍数有极显著的影响(表 3)。多重比较结果表明,蓝靛果忍冬外植体在 5 号培养基中诱导率最高,达 97%。NAA 的 3 个水平中,0.15 mg/L 的增值倍数最大;6-BA 的 3 个水平中,1.50 mg/L 的增值倍数最大。确定蓝靛果忍冬 J-12 诱导叶芽分化及增值的最佳培养基及激素配比是 MS + NAA 0.15 mg/L + 6-BA 1.50 mg/L,增值倍数可达 8.0 倍。

2.4 最佳生根培养基的筛选 将诱导出的丛生不定芽切成高 2.5~3.0 cm 的若干单株,接入生根培养基中进行诱导生根。培养到 20 d 左右时,试管苗开始长根。接种到 1~3 号生根培养基上的试管苗均能长出白色的根,但根的数量和长度存在显著差异。由表 4 可知,3 号生根培养基生根效果最

好,培养到 30 d 左右时,生根率达 100.00%,平均根长 8.3 cm,此时试管苗健壮,可进行炼苗。

表 3 不同激素浓度对叶芽分化的影响

Table 3 Effects of different hormone concentrations on leaf buds differentiation

组别 Groups	NAA 浓度 NAA conc- entration mg/L	6-BA 浓度 6-BA conce- ntration mg/L	诱导率 Induction rate	增值倍数 Proliferation multiple
1	0.10	1.00	67 d	2.1 e
2	0.10	1.50	83 ab	3.8 cd
3	0.10	2.00	76 bc	3.0 d
4	0.15	1.00	86 ab	4.3 bc
5	0.15	1.50	97 a	8.0 a
6	0.15	2.00	83 ab	3.6 cd
7	0.20	1.00	71 c	2.5 de
8	0.20	1.50	77 bc	5.0 b
9	0.20	2.00	81 ab	4.1 c

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05)
Note: Different small letters within the same column mean significant differences (P<0.05)

表 4 不同培养基配方诱导生根情况

Table 4 The induced condition of root under different culture medium

组别 Groups	培养基配方 Medium formula	生根率 Rooting percentage %	生根数 Rooting number 条/株	平均根长 Average root length cm
1	1/2MS	57.14	4.0 c	2.6 c
2	1/2MS + IBA1.00 mg/L + NAA0.20 mg/L	87.50	5.2 b	4.1 b
3	1/2MS + IBA0.50 mg/L + NAA0.20 mg/L	100.00	8.0 a	8.3 a

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05)
Note: Different small letters within the same column mean significant differences (P<0.05)

2.5 移栽基质的选择 准备 3 种移栽基质:细沙、草炭土:细沙=2:1、珍珠岩。试管苗经炼苗后,分别栽入 3 种基质中。栽培 35 d 后统计试管苗的成活率及苗高。由表 5 可知,不同移栽基质对试管苗的成活率和苗高都有显著影响。试管苗在细沙基质中成活率达 80%;在草炭土+细沙的混合基质中成活率达 92%,苗高最高(10.80 cm);在珍珠岩基质中成活率较低(44%),可见最佳移栽基质为草炭土:细沙=2:1。

表 5 不同栽培基质对蓝靛果组培苗移栽成活率和苗高的影响

Table 5 Effects of different culture medium on the survival rate and seedling height of tissue culture seedling of *Lonicera edulis*

组别 Groups	栽培基质 Culture substrate	成活率 Survival rate//%	苗高 Seedling height//cm
1	细沙 Fine sand	80 ab	5.60 b
2	草炭土+细沙 Turfy soil + fine sand	92 a	10.80 a
3	珍珠岩 Perlite	44 c	3.60 c

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05)
Note: Different small letters within the same column mean significant differences (P<0.05)

表 3 2007 年长沙地区干旱与森林火灾情况
Table 3 Drought and forest fires in Changsha area in 2007

时间 Time	干旱情况 Drought situation	森林火灾情况 Forest fires situation
1—3 月 January – March	8 d	1 月末连续 8 d 的连晴干燥天气催生了十余起森林火灾
4 月 April	4 月 11—28 日	4 月上中旬就发生 104 起火警,到 4 月末,受灾面积达 120 hm ²
5 月 May	5 月 5—31 日	发生林火 239 起,受灾面积 15.06 hm ²
6—8 月 June – August	连续 2 个月持续干旱	由于干旱导致山塘缺水,长沙县星沙镇的一起森林大火扑救延误
9—12 月 September – December	10 月 9 日—12 月 20 日	11 月 26 日宁乡县一次森林大火,持续近 28 h,烧毁山林 20 hm ² 以上

被含水率下降,下降到一定程度,森林火灾容易发生。2007 年的火灾情况分析表明,森林火灾多发生在干旱条件下的连晴时段内。

森林火灾部分由人为原因引发,上述分析由于资料限制,没有排除人为原因火灾,如在火灾情况分析中,能剔除掉部分人为原因火灾,则干旱对森林火灾影响分析能够更加客观。

参考文献

[1] 薛丽. 湖南大型灌区干旱风险管理分析、评价[J]. 湖南水利水电, 2013 (3):45 –49.

[2] 王淮永. 湖南省典型农业干旱区基本农田保护研究[D]. 长沙:中南林业科技大学, 2015.

[3] 彭元琪. 湖南省农业旱灾恢复性资源评价及优化研究[D]. 湘潭:湖南科技大学, 2014.

[4] 熊见红. 长沙市水资源短缺状况分析及对策[J]. 人民长江,2003,34 (2):12 –13,23.

[5] 刘珊,颜智勇. 湘江流域长沙段水资源问题分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2009,35(1):64 –67.

[6] 周庆年. 打造绿色星城 建设生态长沙[J]. 湖南林业,2010,8(1):1.

[7] 徐明超,马文婷. 干旱气候因子与森林火灾[J]. 冰川冻土,2012,34(3): 603 –608.

[8] 任金鑫,肖慧娟,张超,等. 持续干旱对森林火灾的影响研究综述[J]. 内蒙古林业调查设计,2013,36(5):135 –138.

[9] 张剑明. 近 36 年来湖南省干旱的时空分布特征[D]. 长沙:湖南师范大学, 2008.

[10] 张调风,张勃,王有恒,等. 基于综合气象干旱指数的石羊河流域近 50 年气象干旱特征分析[J]. 生态学报,2013,33(3):975 –984.

[11] 刘纪远,匡文慧,张增祥,等. 20 世纪 80 年代末以来中国土地利用变化的基本特征与空间格局[J]. 地理学报,2014,69(1):3 –14.

[12] 金菊良,杨齐祺,周玉良,等. 干旱分析技术的研究进展[J]. 华北水利水电大学学报(自然科学版),2016,37(2):1 –15.

[13] 张强,高歌. 我国近 50 年旱涝灾害时空变化及监测预警服务[J]. 科技导报,2004(7):21 –24.

[14] 王雷. 线性修正趋势分析技术在环境质量预警预测中的应用[J]. 干旱环境监测,2010,24(3):171 –176.

[15] 文定元. 森林防火基础知识[M]. 北京:中国林业出版社,1995.

[16] 张大明,杨雨春,张维胜,等. 可燃物含水率与气象因子相关关系预测模型的研究[J]. 吉林林业科技,2010,39(3):27 –30.

(上接第 156 页)

3 结论

- (1)加拿大蓝靛果忍冬优良品种 J – 12 的叶芽为最佳诱导外植体。
- (2)最佳消毒时间组合为 75% 乙醇 10 s 与 2% NaClO 4 min,污染率低至 2%。
- (3)诱导叶芽分化及增殖的最佳培养基及激素配比是 MS + NAA0. 15 mg/L + 6 – BA1. 50 mg/L,增殖倍数最高可达 8.0 倍。
- (4)最佳生根培养基为 1/2MS + IBA0. 50 mg/L + NAA0. 20 mg/L,生根率为 100. 00%。
- (5)最佳移栽基质为草炭土: 细沙 = 2: 1,成活率达 92%。

参考文献

[1] 王秀锁,孙秀殿,白艳春. 蓝靛果的利用及栽培[J]. 特种经济动植物, 2002(6):34.

[2] 王宏涛,叶云,肖顺林,等. 蓝靛果乙酸乙酯提取物对胃溃疡大鼠胃黏膜血管活性物质的影响[J]. 辽宁中医杂志,2007,34(3):360 –361.

[3] WANG H,CAO G H,PRIOR R L. Total antioxidant capacity of fruits[J]. Journal of agricultural and food chemistry,1996,44(3):701 –705.

[4] WANG S Y,BOWMAN L,DING M. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells [J]. Food chemistry,2008,107(3): 1261 –1269.

[5] 马自超. 蓝靛果(*Lonicera caerulea*)中的花青素色素的研究[J]. 中国野生植物资源,1996(2):1 –5.

[6] 王燕兰,沈卓群,姚贵良,等. 兰靛果天然食用红色素[J]. 中国野生植物,1990(4):1 –13.

[7] 戚向阳,彭光华. 兰靛果色素的特性研究[J]. 湖北农业科学,2003(1): 70 –73.

[8] 向延菊,王大伟. 蓝靛果忍冬的研究利用现状及其发展前景[J]. 塔里木农垦大学学报,2004,16(4):26 –29.

[9] 古丽江·许库尔汗. 俄罗斯的蓝靛果忍冬品种[J]. 落叶果树,2012,44 (1):62 –65.

[10] 兰士波,罗旭,李渭. 蓝靛果忍冬研究进展及开发应用前景[J]. 中国林副特产,2008(1):87 –90.

[11] 周以良. 黑龙江植物志[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社,1998:76.

[12] 黄普华,邵忠文,卓丽环. 我国东北地区蓝靛果初步研究[J]. 国土与自然资源研究,1982(1):57 –62.

[13] 李恒,邢桂菊,廉美丹. 药用植物——蓝靛果[J]. 中国林副特产,2002 (1):10.

[14] DING M,FENG R,WANG S Y, et al. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity [J]. Journal of biological chemistry, 2006, 281: 17359 –17368.

[15] JIN C,CAO H N,ZONG C W, et al. Research on tissue culture and rapid propagation technology of superior individuals of *Lonicera edulis* Turcz. [J]. Agricultural science & technology,2011,12(11):1585 –1588.

[16] 梁琦兰,张启昌,杨振国,等. 蓝靛果忍冬芽体组织培养技术研究[J]. 北华大学学报(自然科学版),2006,7(6):549 –551.

[17] 李桂君,李艳霞,卢慧颖,等. 俄罗斯耐寒蓝靛果忍冬组织培养技术研究[J]. 林业科技,2012,37(4):219 –220.